

Hideaki SUZUKI
Filed: 11-20-2000
Atty Docket 2167-
BSKB
(703) 205-8000

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

09/715172
JCS62 U.S. PTO

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

2000年 2月 3日

出 願 番 号

Application Number:

特願2000-026829

出 願 人

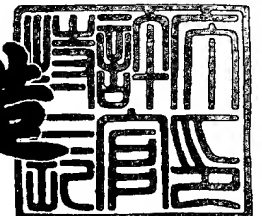
Applicant (s):

大日精化工業株式会社

2000年 9月18日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2000-3072250

【書類名】 特許願
【整理番号】 KM-038
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 G01N 33/53
G01N 33/50

【発明者】

【住所又は居所】 東京都日野市南平四丁目19番2号 多摩南平パークス
クエア119号

【氏名】 青木 洋祐

【発明者】

【住所又は居所】 東京都足立区堀之内一丁目9番4号 大日精化工業株式
会社 技術研究センター内

【氏名】 鈴木 英明

【発明者】

【住所又は居所】 東京都足立区堀之内一丁目9番4号 大日精化工業株式
会社 技術研究センター内

【氏名】 高橋 樹由

【発明者】

【住所又は居所】 東京都足立区堀之内一丁目9番4号 大日精化工業株式
会社 技術研究センター内

【氏名】 葛城 寿史

【特許出願人】

【識別番号】 000002820

【氏名又は名称】 大日精化工業株式会社

【代表者】 高橋 靖

【代理人】

【識別番号】 100087918

【弁理士】

【氏名又は名称】 久保田 耕平

【電話番号】 03(3264)8091

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 067069

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9704477

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 多発性硬化症の診断方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ヒト血液試料中のヒトメダラシン量を免疫学的方法を用いて正確に測定し、その測定値の大小及び／又は増減により多発性硬化症の発症及び／又は病勢を診断することを特徴とする多発性硬化症の診断方法。

【請求項 2】 ヒト血液試料を浸透圧が $250\text{mOsm/kg}\cdot\text{H}_2\text{O}$ より低い水性液体か、又は $310\text{mOsm/kg}\cdot\text{H}_2\text{O}$ より高い水性液体で処理して白血球を完全に破壊した後、抗ヒトメダラシン抗体を用いてヒトメダラシンを測定し、その測定値の大小及び／又は増減により多発性硬化症の発症及び／又は病勢を診断することを特徴とする多発性硬化症の診断方法。

【請求項 3】 前記抗ヒトメダラシン抗体の少なくとも一つが抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体である請求項 2 に記載の多発性硬化症の診断方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、多発性硬化症の診断方法に関するものであり、更に詳しくは、血液中のヒトメダラシン量から多発性硬化症を簡便に診断する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

セリンプロテアーゼの一種であるメダラシンは顆粒球等に存在し、炎症、特に慢性炎症の発現を含めて広く生体防御機構において重要な役割を演じていると考えられる。顆粒球メダラシンは多くの慢性炎症性疾患の増悪期で増大し、寛解期で正常化するが、多発性硬化症の患者では増悪する数日前に著増し、寛解に先行して正常化することが認められている。多発性硬化症は、中枢神経系の白質に限局性の脱髄巣とグリオーシスの出現を特徴とし、寛解と悪化を繰り返しながら進行し、多くは、10～15年の経過で死亡すると云う慢性炎症性の難病であり、原因については、未だ、はっきりとは解明されていないが、ウィルスや細菌が免疫系を刺激して抗体が自らの神経組織を攻撃する自己免疫疾患の一種ではないかと考

えられている。また、その診断法はなかなか難しく、核磁気共鳴造影法（MRI）や髄液の検査等によって行なわれているのが現状であるが、MRIは非常に大がかりな装置を用い、測定操作も熟練を要し、経費もかかる方法であり、髄液を検査する方法は患者に大きな苦痛を与える等の問題点があり、簡便な検査で病気の診断、病勢の把握、予後の推定等が行なえる方法が検討され、血液中の顆粒球メダラシン量による診断の可能性が提唱されている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、血液中のメダラシン量で多発性硬化症が診断できるか否かについては、相当量の臨床データを検証して判断することが必要であるが、今までにはそのようなデータは存在せず、また、血液中の顆粒球メダラシン量の測定値はバラツキが大きく正確な測定値が得にくいことから正しい診断が行い難く、血液中のメダラシン量で多発性硬化症が診断できるか否かについては確証がないのが実状であった。本発明は上記事情に鑑みなされたもので、血液中のメダラシン量を正確に測定し、その測定値の大小及び／又は増減により多発性硬化症の診断を行う簡便な方法を提供することを目的とする。

【0004】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記目的を達成するために鋭意研究を行なった結果、ヒト血液試料中のヒトメダラシン量を測定し、その測定値の大小及び増減が多発性硬化症の発症及びその病勢等と密接に関係していることを見出し、これらの知見に基づいて本発明に到達したものである。

【0005】

従って、本発明の第一は、ヒト血液試料中のヒトメダラシン量を免疫学的方法を用いて正確に測定し、その測定値の大小及び／又は増減により多発性硬化症の発症及び／又は病勢を診断することを特徴とする多発性硬化症の診断方法に関するものである。

【0006】

また、本発明の第二は、ヒト血液試料を浸透圧が $250\text{mOsm/kg}\cdot\text{H}_2\text{O}$ より低い水

性液体か、又は $310\text{mOsm/kg}\cdot\text{H}_2\text{O}$ より高い水性液体で処理して白血球を完全に破壊した後に、抗ヒトメダラシン抗体を用いてヒトメダラシンを測定し、その測定値の大小及び／又はその増減により多発性硬化症の発症及び／又は病勢を診断することを特徴とする多発性硬化症の診断方法に関するものである。

【0007】

【発明の実施の形態】

以下、本発明につき更に詳しく説明する。

本発明において多発性硬化症の診断に用いられるヒト血液試料中のヒトメダラシンの大部分は、血液中に存在する白血球成分の一つである顆粒球の内部に存在しているので、顆粒球を完全に破壊してヒトメダラシンを全て細胞外に放出させてから測定することが正確な測定値を得るための必須要件である。従って、この必須要件が完全に満たされない場合には測定値はバラツキが大きく、再現性の乏しいデータしか得られない。

【0008】

血液試料中の顆粒球を完全に破壊する方法としては、血液と異なる浸透圧を有する水性液体で処理する方法が最も簡便で実用的である。ヒト血液の浸透圧は約 $280\sim 290\text{mOsm/kg}\cdot\text{H}_2\text{O}$ の範囲にあるので、 $250\sim 310\text{mOsm/kg}\cdot\text{H}_2\text{O}$ の範囲の水性液体では血液中に存在する顆粒球を完全に破壊することは難しい。従って、ヒト血液中の顆粒球の完全な破壊は浸透圧が $250\text{mOsm/kg}\cdot\text{H}_2\text{O}$ より低い水性液体か、又は $310\text{mOsm/kg}\cdot\text{H}_2\text{O}$ より高い水性液体で血液を希釈することで達成することができる。このような水性液体としては、水混和性有機溶媒を含んでいてもよい精製水、無機酸塩、有機酸塩、糖類、糖アルコール類、アミノ酸類、及び蛋白質等の水溶性物質からなる溶質の濃度が非常に高い水溶液、又はこれらの溶質の濃度が非常に低い水溶液等の水性液体であり、顆粒球を完全に破壊し得る浸透圧を有する水溶液及び緩衝液などを用いることができる。また、該水性液体の使用量は、血液試料に対して容積単位で $50\sim 10$ 万倍、好ましくは $100\sim 1$ 万倍、特に好ましくは $500\sim 2$ 千倍である。

【0009】

このようにして得られた顆粒球を完全に破壊したヒト血液試料の水性希釈液を

試料とするヒトメダラシンの免疫学的測定方法は、測定試料を標識化した抗原又は抗体の存在下に抗ヒトメダラシン抗体と接触させ、抗原抗体反応により標識化免疫複合体として捕捉する免疫反応段階と、生成した該免疫複合体をその分子中に存在する標識物質を用いて測定する検出段階とからなる。免疫反応段階を構成する抗原抗体反応の方法は任意である。

【 0 0 1 0 】

例えば、

- ①不溶性担体に結合した抗体に試料中の測定すべき抗原を捕捉させた後に標識抗体を反応させるサンドイッチ法、
- ②サンドイッチ法において、不溶性担体に結合した抗体と異なる動物種に由来する抗体を用い、生成したサンドイッチ錯体に対して、更にこの抗体に対する標識した第二抗体を反応させる二抗体法、
- ③不溶性担体に結合した抗体に試料中の測定すべき抗原をペルオキシダーゼ酵素標識抗原の存在下で反応させる競合法、
- ④測定すべき抗原を含有する試料にこれらと特異的に反応する標識抗体を作用させて凝集沈殿させた後、遠心分離により分離した免疫複合体中の標識物質を検出する凝集沈殿法、更に、
- ⑤ビオチン標識抗体に標識アビジンを反応させるビオチン－アビジン法等を非限定的に用いることができる。

【 0 0 1 1 】

本発明の多発性硬化症の診断に有用なメダラシンの免疫学的測定において不溶性担体を用いる場合には、不溶性担体としては、例えば、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリエステル、ポリアクリロニトリル、フッ素樹脂、架橋デキストラン、ポリサッカライド等の高分子化合物、その他、ガラス、金属、磁性粒子及びこれらの組み合わせ等が挙げられる。また、不溶性担体の形状としては、例えば、トレイ状、球状、繊維状、棒状、盤状、容器状、セル、マイクロプレート、試験管等の種々の形状で用いることができる。更に、これら不溶性担体への抗原又は抗体の固定化方法は任意であるが、物理的吸着法、共有結合法、イオン結合法等を用いることができる。

【0012】

尚、本発明におけるメダラシンの免疫学的測定のために用いられる抗体類のクラスは任意であるが、IgG クラスの抗体が好適に用いられる。また、抗体はモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体のいずれを使うことも可能であるが、モノクローナル抗体が好ましい。また、それらの形態としては全抗体又は $F(ab')_2$ 、Fab 等の断片を用いることができる。また、抗体の起源は任意であるが、マウス、ラット、兎、羊、山羊、鶏等に由来する抗体が好適に用いられる。

【0013】

次いで、このようにして捕捉されたヒトメダラシンの標識化免疫複合体を検出段階で測定するための標識物質としては、酵素、蛍光物質、発光物質及び放射性物質等を使用するのが好適である。このような酵素としては、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -D-ガラクトシダーゼ等、蛍光物質としては、フルオレッセインイソシアネート、フィコビリプロテイン等、発光物質としては、ルミノール類、ジオキセタン類、アクリジニウム塩類等、放射性物質としては、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{111}In 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 等を非限定的に挙げることができる。標識物質が酵素である場合には、その活性を測定するために基質、必要により発色剤、蛍光剤、及び発光剤等が用いられる。酵素としてペルオキシダーゼを用いる場合には、基質として過酸化水素等を用い、発色剤として2,2'-アジノジ[3-エチルベンズチアゾリンスルホン酸]アンモニウム塩 (ABTS)、5-アミノサリチル酸、o-フェニレンジアミン、4-アミノアンチピリン、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン等、蛍光剤としては4-ヒドロキシフェニル酢酸、3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオン酸等、発光剤としてはルミノール類、ルシゲニン電荷移動錯体等、酵素としてアルカリホスファターゼを用いる場合には、基質として4-ニトロフェニルホスフェート、4-メチルウムベリフェリルホスフェート、コルチゾール-21-ホスフェート等、酵素として β -D-ガラクトシダーゼを用いる場合には、2-ニトロフェニル- β -D-ガラクトシド、4-メチルウムベリフェリル- β -D-ガラクトシド、3-(2'-スピロアダマンタン)-4-メトキシ-4(3''- β -D-ガラクトシルオキシフェニル)-1,2-ジオキセタン (AMPGD) 等を用いることができる。

【0014】

本発明においてヒトメダラシンの免疫学的測定に使用することができるポリクローナル抗体は、従来公知の方法でヒトメダラシンを抗原として動物に免疫して得られる抗ヒトメダラシン抗血清の抗体成分として分離精製されたものが好ましい。なかでも例えば、山羊抗ヒトメダラシンーポリクローナル抗体、兎抗ヒトメダラシンーポリクローナル抗体等が好適に用いられる。また、本発明に使用することができるモノクローナル抗体及びその製造方法については、先に出願された特開平11-151085号公報（発明の名称「抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体、その製造方法及びそれを用いる免疫学的測定方法」）に詳細に説明されている。

【0015】

即ち、多発性硬化症の診断に有用なヒトメダラシンの免疫学的測定に使用することのできる抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体は、健常人血液から分離した顆粒球より抽出したヒトメダラシンで免疫した動物から採取した抗体産生細胞とミエローマ細胞との細胞融合により調製されるハイブリドーマを培地上で培養するか、又は動物腹腔内に投与して腹水内で増殖させた後、該培養物又は腹水から採取することにより製造される。

【0016】

抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、抗原としてメダラシンを用いて免疫した動物から採取した抗体産生細胞をミエローマ細胞と融合させることにより得られるハイブリドーマを選択的に増殖させ、該ハイブリドーマから検索しクローニングにより製造することができる。

【0017】

上記の抗体産生細胞としては、例えばヒトメダラシン又はこれを含む組成物又は細胞を投与して免疫した動物から得られる脾臓細胞、リンパ節細胞、B-リンパ球等が挙げられる。免疫する動物としてはマウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ウマ等が挙げられる。免疫は、例えばヒトメダラシンをそのまま又は適当なアジュバントと共に動物の皮下、筋肉内又は腹腔内に約 $1\mu\text{g}\sim 1\text{mg}$ /回を1～2回/月、1～6ヶ月間投与することにより行なわれる。抗体産生細胞の分離は、最終免疫から2～4日後に免疫動物から採取することにより行なわれ

る。

ミエローマ細胞としては、マウス、ラット由来のもの等を使用することができる。抗体産生細胞とミエローマ細胞とは同種動物由来であることが好ましい。

【0018】

細胞融合の方法は任意であるが、例えばダルコッペ改変イーグル培地（DME M）等の培地中で抗体産生細胞とミエローマ細胞とをポリエチレングリコール等の融合促進剤の存在で混合することにより行なうことができる。

細胞融合終了後、DMEM等で適当に希釈し、遠心分離し、沈殿をHAT培地等の選択培地に懸濁して培養することによりハイブリドーマを選択する。次いで、培養上清を用いて酵素抗体法により抗体産生ハイブリドーマを検索し、限界希釈法等によりクローニングを行ない、抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得ることができる。

【0019】

このようにして得られた抗体産生ハイブリドーマを培地中又は生体内で培養しモノクローナル抗体を培養物から採取する。モノクローナル抗体を大量に製造するには、該ハイブリドーマをミエローマ細胞の由来細胞と同種の動物腹腔内に投与し、その腹水中にモノクローナル抗体を蓄積させ、腹水から採取する方法を採ればよい。

【0020】

培養物又は腹水からのモノクローナル抗体の分離は、IgG 精製に通常使用される硫酸分画法、陰イオン交換体又はプロテインA、G等のカラムによるクロマトグラフィーによって行なうことができる。

このようにして得られた抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体は、これを産生するハイブリドーマの種類により3F03、3G03、2E04、及び1G12の4種類存在する。これらのモノクローナル抗体は、いずれもグロブリンクラスはIgGで、サブクラスはIgG₁であり、いずれの抗体も抗原であるヒトメダラシンと特異的に反応し、多発性硬化症の診断のためのヒトメダラシンの免疫学的測定には有用である。

【0021】

本発明の多発性硬化症の診断方法としては、測定された血液試料中のヒトメダラシン濃度、及び同じ血液試料を用いて測定した血液試料中の顆粒球数から 10^8 個の顆粒球中のヒトメダラシン量を算出し、その値のカット・オフ値（健常人の平均値 $\pm 2SD$ （標準偏差））との大小を比較して多発性硬化症の発症を判断するか、又は経時測定の数値の増減を比較して病勢の経時変化を判断する方法等が好ましく用いられる。

【0022】

この方法により測定した多発性硬化症患者112名のうち、85名のメダラシン値がカット・オフ値以上の陽性であり、その陽性率は75.8%と高く、対照の種々の非炎症性神経性疾患患者80名のうち、カット・オフ値以上の陽性者は13名でその陽性率は16.3%と低く、血液中のヒトメダラシン値による多発性硬化症の診断は非常に信頼性の高い診断方法であることが認められる。尚、健常人のメダラシン値の陽性率は0%であった（表1及び図2参照。）。また、多発性硬化症患者のメダラシン値の水準の男女による差（図3参照。）及び年齢による差（図4参照。）は認められないことが判った。

【0023】

【実施例】

以下、参考例と共に、実施例を示し、本発明を具体的に説明する。もっとも、本発明は下記の実施例等により限定されるものではない。

【0024】

〔実施例1〕

ヒトメダラシン測定用検量線の作成

(1) モノクローナル抗体固定化ビーズの調製

ポリスチレン製ビーズ（直径6mm）をよく洗浄してから、マウス抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体（3F03） $10\mu\text{g/ml}$ を含むPBS（pH7.4）溶液中に4℃の温度で1昼夜放置した後、PBSで洗浄し、1%BSA水溶液に4℃の温度で1昼夜放置してブロッキング処理を施すことによりモノクローナル抗体固定化ビーズが得られた。

【0025】

(2) ペルオキシダーゼ標識モノクローナル抗体の調製

マウス抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体 (2E04) 1.0mg/ml を含む P B S 溶液に、N- (m-マレイミド安息香酸) -N-サクシンイミドエステル (M B S) の 10mg/ml の濃度のジメチルホルムアミド溶液 0.1ml を添加し、25℃ の温度で 30 分間反応させる。次いで、この反応混合液をセファデックス G-25 を充填したカラムを用い、0.1M リン酸緩衝液 (pH 6.0) でゲル濾過を行ない、マレイミド化モノクローナル抗体と未反応 M B S とを分離した。

一方、ペルオキシダーゼ酵素としてホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ (H R P) の 1.0mg/ml の P B S 溶液に、N-サクシンイミジル-3-(2-ピリジルチオ) プロピオネート (S P D P) の 10mg/ml の濃度のエタノール溶液を添加し、25℃ の温度で 30 分間反応させる。次いで、この反応混合液をセファデックス G-25 を充填したカラムを用い、10mM 酢酸緩衝液 (pH 4.5) でゲル濾過して精製、ピリジルジスルフィド化 H R P を含有する画分を採取し、これをコロジオンバック中において氷冷下に約 10 倍に濃縮する。次に、これに 0.1M ジチオスレイトールを含有する 0.1M 酢酸緩衝生理食塩水 (pH 4.5) 1ml を添加して、25℃ の温度で 30 分間攪拌して H R P 分子中に導入したピリジルジスルフィド基を還元した後、この反応混合液をセファデックス G-25 を充填したカラムを用いてゲル濾過し、チオール化 H R P を含有する画分が得られた。

次に、マレイミド化モノクローナル抗体とチオール化 H R P とを混合し、コロジオンバックを用いて氷冷下に 4mg/ml の蛋白質濃度まで濃縮し、4℃ で一昼夜放置した後、ウルトロゲル A c A 44 (SEPRACOR 社) を充填したカラムを用いてゲル濾過し、ペルオキシダーゼ酵素標識モノクローナル抗体が得られた。

【 0 0 2 6 】

(3) ヒトメダラシンのサンドイッチ酵素免疫測定方法

マウス抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体 (3F03) を固定化したビーズ各 1 個と、精製したヒトメダラシン (標準物質) 0, 1, 10, 100, 200ng/ml の濃度で含有する 2% B S A 含有 P B S 溶液 50 μ l と 2 % B S A 含有 P B S 溶液 350 μ l とを加え 37℃ の温度で 30 分間インキュベートし、次いで試験管内の溶液を吸引除去した後、生理食塩水で洗浄してから H R P 標識マウス抗ヒトメダラシンモノクロー

ナル抗体 (2E04) を $0.2 \mu\text{g/ml}$ の濃度で含有する 2% BSA 含有 PBS 溶液 $400 \mu\text{l}$ を試験管に充填して 37°C の温度で 30 分間インキュベートした。次に、試験管内の溶液を吸引除去した後、生理食塩水で洗浄してから、0.05% ABTS、及び 0.0034% 過酸化水素を含む 0.1M リン酸クエン酸緩衝液 (pH4.6) を $400 \mu\text{l}$ ずつ各試験管内に加え、 37°C の温度で 30 分間インキュベートした後、反応停止剤として 0.1N シュウ酸水溶液を 1 ml ずつ加えて酵素反応を停止させた。次いで、この溶液を分光光度計を用いて 420 nm の波長の吸光度を測定し、これを標準物質濃度に対してプロットすることにより、図 1 に示されるような濃度依存性の良い検量線が得られた。

【 0 0 2 7 】

〔実施例 2〕

血液試料中のヒトメダラシン値の算出及び疾患の診断

健常人、多発性硬化症患者及び非炎症性神経性疾患患者の血液をそれぞれ採取して凍結保存した試料を室温に戻して融解させ、その $10 \mu\text{l}$ を採取して精製水（浸透圧 = $0 \text{ mOsm/kg} \cdot \text{H}_2\text{O}$ ） 2 ml 中に加えボルテックスミキサーを用いて十分混合して検体溶液とした後、その $10 \mu\text{l}$ を試験管に添加し、これに 2% BSA 含有 PBS (pH7.4) $390 \mu\text{l}$ を加えて希釈した。次に、この試験管にマウス抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体 (3F03) を固定化したビーズ各 1 個を加え 37°C の温度で 30 分間インキュベートし、次いで試験管内の溶液を吸引除去した後、生理食塩水で洗浄してから HRP 標識マウス抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体 (2E04) $0.2 \mu\text{g/ml}$ の濃度で含有する 2% BSA 含有 PBS 溶液 $400 \mu\text{l}$ を試験管に充填して 37°C の温度で 30 分間インキュベートした。次に、前述の検量線を作成する場合と全く同じ操作により、洗浄、酵素反応及び反応停止を行なった後、分光光度計を用いて 420 nm の波長の吸光度を測定し、検量線よりヒトメダラシン濃度を求めた。得られたヒトメダラシン濃度及び各血液試料を用いて測定した顆粒球数から 10^8 個の顆粒球中のメダラシン量を示すヒトメダラシン値 ($\mu\text{g}/10^8$ 顆粒球) を算出し、図 2 に示す。

【 0 0 2 8 】

図 2 は、健常人、多発性硬化症患者及び非炎症性神経性疾患患者のそれぞれの

メダラシン値の比較を示す。同図より、

多発性硬化症患者 : 355 ± 117 (n=112)

非炎症性神経疾患患者 : 233 ± 66 (n=80)

健常人 : 213 ± 34 (n=25)

の結果を得た。その結果をカット・オフ値($281 \mu\text{g}/10^8$ 顆粒球)と比較して陽性・陰性に分類してその数及び陽性率を表1に示した。

【0029】

【表1】

表1 臨床血液検体のヒトメダラシン値

検 体	陽性数	陰性数	陽性率 (%)
多発性硬化症患者	85	27	75.8
非炎症性神経性疾患	13	67	16.3
健常人	0	25	0.0

【0030】

以上の結果より、血液中のヒトメダラシン値による多発性硬化症の診断は非常に信頼性の高い診断方法であることが認められた。また、多発性硬化症患者のメダラシン値の水準を男女別(図3参照。)及び年齢別(図4参照。)に分類した処、次の結果を得た。

【0031】

多発性硬化症患者

女性 : 351 ± 107 (n=78)

男性 : 367 ± 143 (n=34)

健常人 214 ± 34 (n=24)

多発性硬化症患者

10代 : 421 ± 154 (n=9)

20代 :	329 ± 94 (n = 26)
30代 :	357 ± 104 (n = 30)
40代 :	330 ± 157 (n = 17)
50代以上 :	375 ± 125 (n = 21)
健常人	213 ± 34 (n = 25)

これらの結果によると、男女による差及び年齢による差は認められないことが判った。

【 0 0 3 2 】

【発明の効果】

本発明の診断方法により、特別の装置を用いることなく、患者等の被検者から採取した血液を分析対象とすることにより、被検者に大きな苦痛を与えることなく、安価かつ容易に多発性硬化症の発症及び／又は病勢を診断することが可能になる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】 実施例 1 記載の酵素免疫測定方法を用いてヒトメダラシン（標準物質）を測定し、その吸光度を抗原濃度の関数としてプロットして作成したヒトメダラシン測定用の検量線である。

【図 2】 血液試料中のヒトメダラシン値（ $\mu\text{g}/10^8$ 顆粒球）を健常人、多発性硬化症及び非炎症性神経性疾患患者別にプロットしたものである。

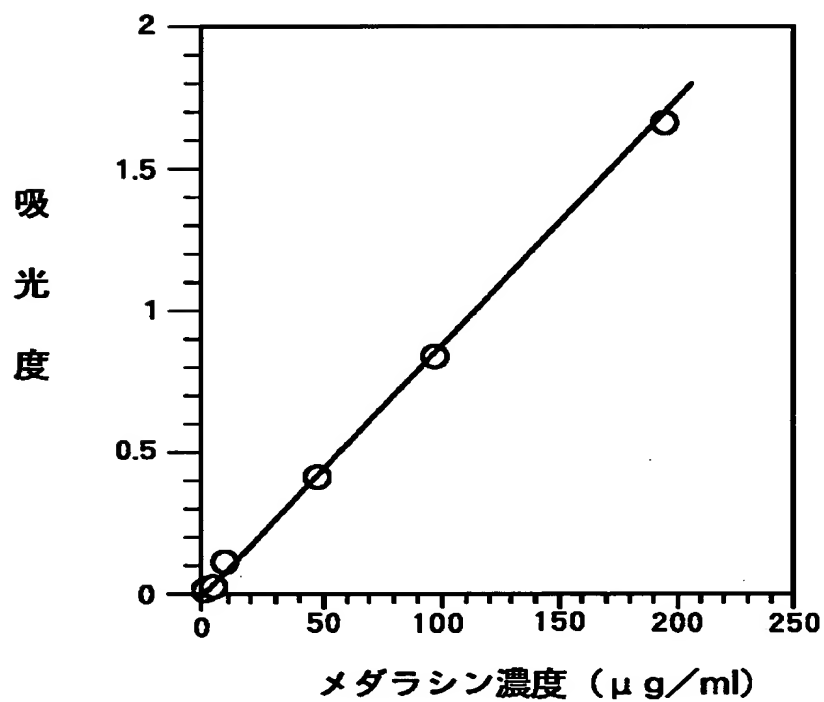
【図 3】 血液試料中のヒトメダラシン値（ $\mu\text{g}/10^8$ 顆粒球）を多発性硬化症患者の男女別にプロットしたものである。

【図 4】 血液試料中のヒトメダラシン値（ $\mu\text{g}/10^8$ 顆粒球）を多発性硬化症患者の年齢別にプロットしたものである。

【書類名】 図面

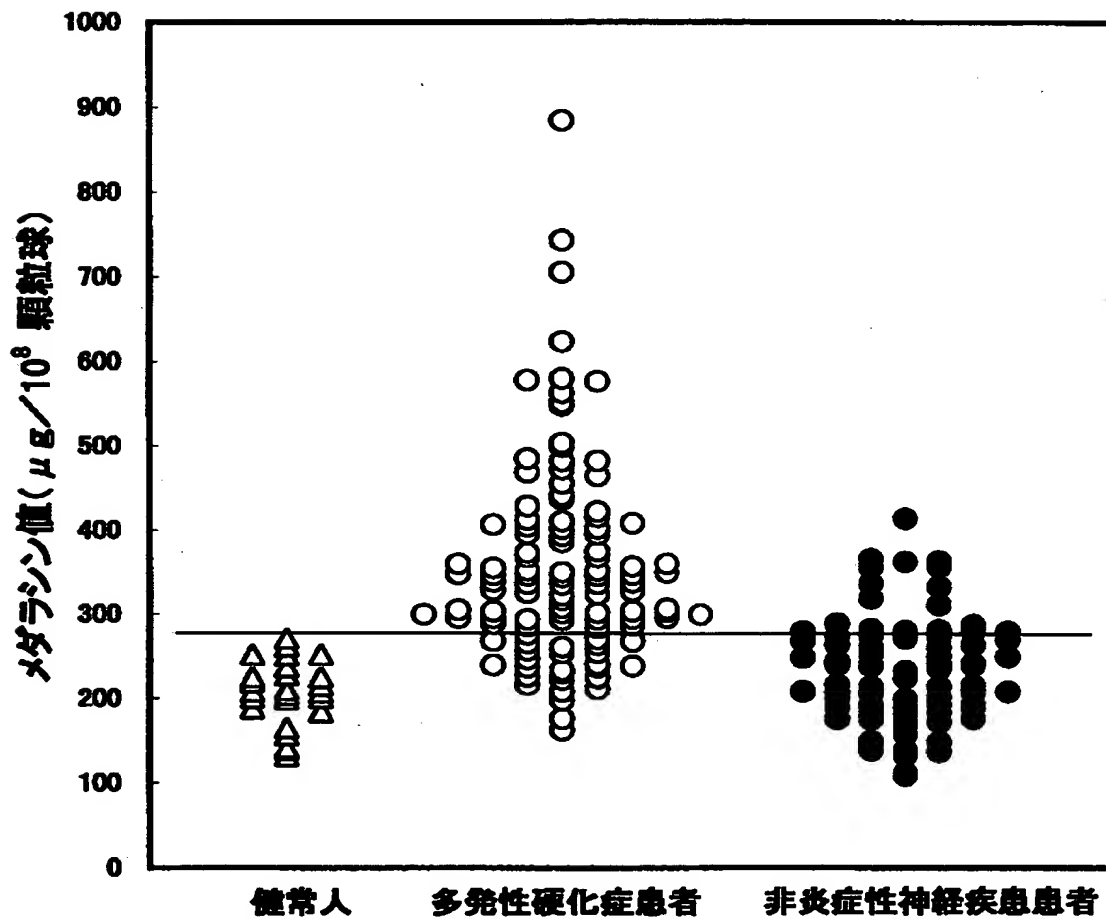
【図 1】

血液試料中のヒトメダラシン測定用検量線



【図2】

多発性硬化症患者と非炎症性神経疾患 患者のメダラシン値の比較

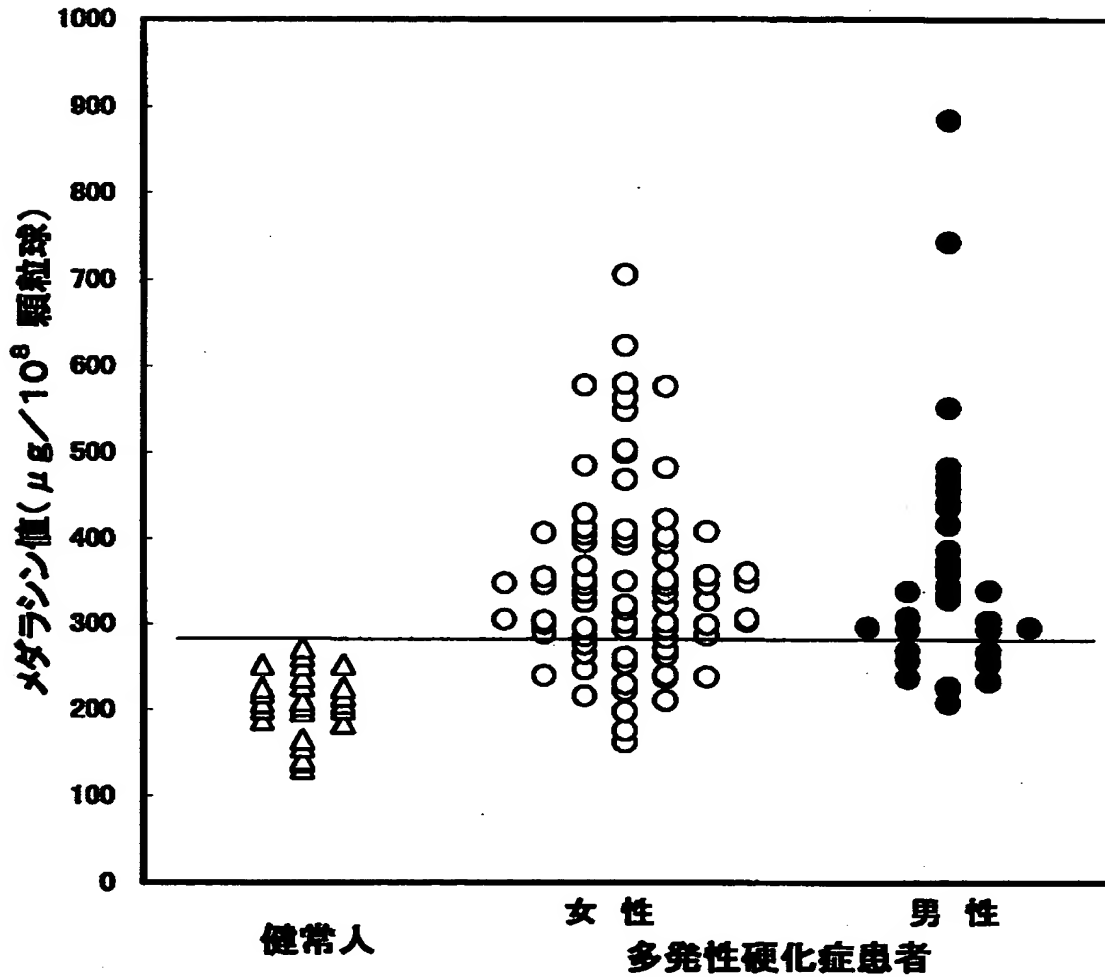


多発性硬化症患者 : 355±117 (n=112)
 非炎症性神経疾患患者 : 233±66 (n=80)
 健常人 : 213±34 (n=25)

カット・オフ値=281(μg/10⁸ 顆粒球)

【図3】

多発性硬化症患者の男女差における メダラシン値の比較



多発性硬化症患者

女性 $351 \pm 107 (n=78)$

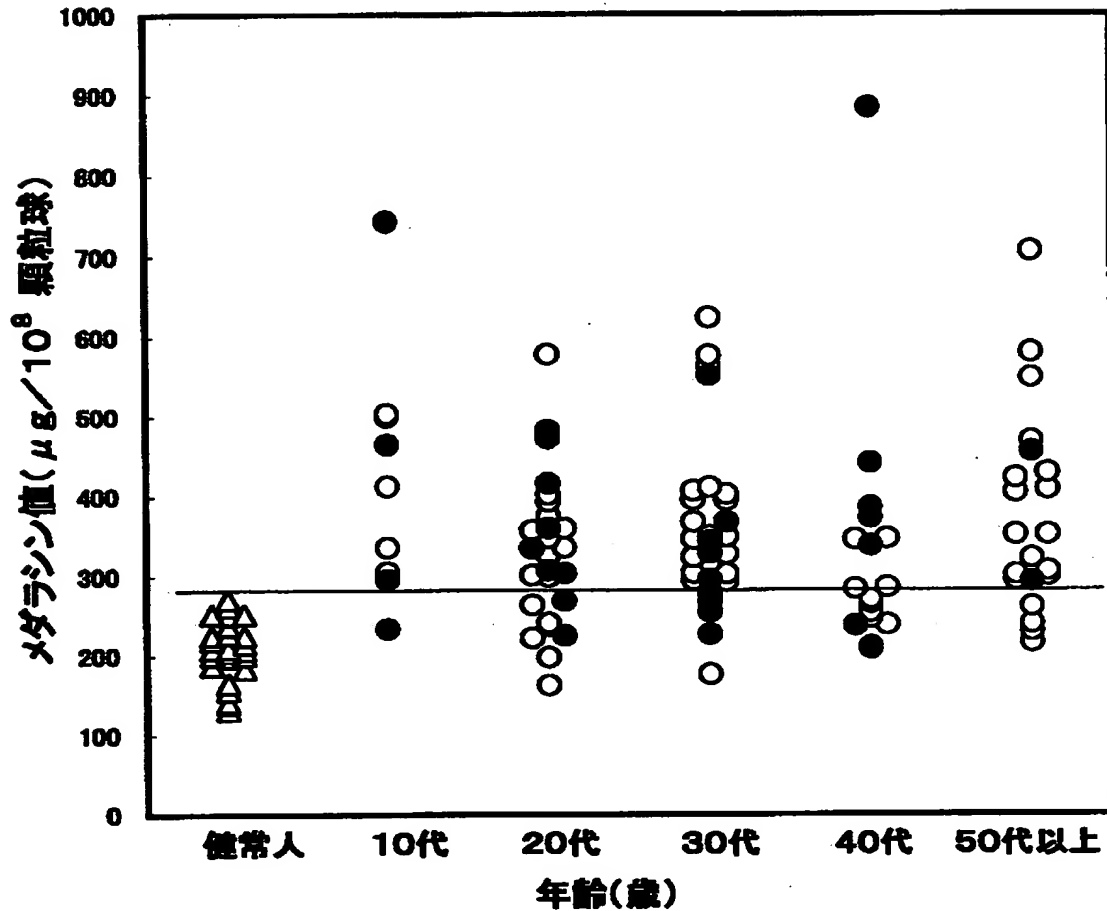
男性 $367 \pm 143 (n=34)$

健康人 $214 \pm 34 (n=24)$

カット・オフ値 = $281 (\mu\text{g}/10^8 \text{ 顆粒球})$

【図4】

多発性硬化症患者の年齢別 メダラシン値の比較



○ : 女性 ● : 男性

多発性硬化症患者

10代 : 421±154 (n=9)

20代 : 329±94 (n=26)

30代 : 357±104 (n=30)

40代 : 330±157 (n=17)

50代以上 : 375±125 (n=21)

健康人 : 213±34 (n=25)

カット・オフ値=281(μg/10⁸ 顆粒球)

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 血液試料中のヒトメダラシン抗体を正確に測定し、その測定値を用いることにより多発性硬化症を診断する簡便な多発性硬化症の診断方法を提供する。

【解決手段】 ヒト血液試料中のヒトメダラシン量を免疫学的方法を用いて特異的にかつ高感度に測定し、その測定値の大小及び／又は増減により多発性硬化症の発症及び／又は病勢を検出する簡便な多発性硬化症の診断方法。

【選択図】 なし

特 2 0 0 0 - 0 2 6 8 2 9

認 定 - 付 加 情 報

特許出願の番号	特願 2 0 0 0 - 0 2 6 8 2 9
受付番号	5 0 0 0 0 1 2 2 0 7 4
書類名	特許願
担当官	第一担当上席 0 0 9 0
作成日	平成 1 2 年 2 月 8 日

< 認定情報・付加情報 >

【提出日】	平成12年 2月 3日
-------	-------------

次頁無

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000002820]

1. 変更年月日	1990年 8月22日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都中央区日本橋馬喰町1丁目7番6号
氏 名	大日精化工業株式会社